UNIVERSITÉ PARIS-V - RENÉ DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE COCHIN - PORT-ROYAL

ANNÉE 1972 **THÈSE** N° 118

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Jacques, Henri, Maurice DANIEL

Né le 15 Septembre 1943, au Puy-Sainte-Réparade (13)

Présentée et soutenue publiquement le

LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE ERYTHROCYTAIRE :

Statistiques ivoiriennes et étude de quelques points fondamentaux

Président : Monsieur G. SCHAPIRA (Professeur)

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir-Delavigne

PARIS-VIe

1972

UNIVERSITE DE PARIS V RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE COCHIN PORT - ROYAL

-:-

Année 1972 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Jacques, Henri, Maurice DANIEL

Né le 15 septembre 1943 au Puy-Sainte-Réparade (13)

-:-

Présentée et soutenue publiquement le

-:-

LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE ERYTHROCYTAIRE :

Statistiques ivoiriennes et étude de quelques points fondamentaux

-:-

Président : Monsieur G. SCHAPIRA (Professeur)

-:-

DACTYLO-SORBONNE
8, rue Casimir Delavigne
PARIS - 6ème
1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme

A ma famille

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549001_0037

A Monsieur le Professeur Georges SCHAPIRA

Professeur à la Faculté de Médecine

Qui nous a fait l'honneur
d'accepter la présidence de
cette thèse

Nous l'en remercions vivement

Nous sommes reconnaissant

au Professeur CABANNES (C.H.U. Abidjan)

pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire pendant notre service militaire et pour la communication de certaines des statistiques présentées ici

LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE ERYTHROCYTAIRE :

Statistiques ivoiriennes et étude de quelques points fondamentaux

-:-

INTRODUCTION

-:-

La D-Glucose-6-Phosphate : NADP oxydoréductase du globule rouge (plus communément appelée Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase ou G-6-P D) a fait l'objet d'études particulièrement nombreuses depuis quelques années. Elle est en effet intéressante à plus d'un titre ; d'un point de vue médical et pratique d'abord puisqu'on a rattaché à une déficience en G-6-P D, certaines crises hémolytiques spontanées ou, plus souvent, provoquée par l'ingestion de certains médicaments ou certains aliments, ainsi que des anémies hémolytiques non sphérocytaires chroniques. Puis on s'est attaché au polymorphisme de cet enzyme à structure polypeptidique, donc soumise au contrôle génétique des protéines ; ainsi on a découvert un grand nombre de mutations. Certaines lui donnent une activité normale et c'est le cas en particulier du type A+ rencontré fréquemment dans les populations africaines et qui diffère du type majoritaire B+ par une mobilité plus grande à l'électrophorèse ; d'autres mutations diminuent de façon appréciable l'activité de l'enzyme ; d'autres encore, mais plus rarement, aboutissent à un accroissement de cette activité. Toutes ces mutations ont été en général bien étudiées du point de vue de leur comportement électrophorétique, de leur activité fonctionnelle, de leurs différentes constantes cinétiques vis-à-vis des deux

substrats de l'enzyme (G-6-P et NADP) et aussi vis-à-vis d'analogues de ces substrats, de leur stabilité thermique, de leur pH optimum et de leur fréquence d'apparition dans certaines populations. C'est ainsi qu'actuellement on a découvert près de 80 mutants bien caractérisés sur tous les continents. Enfin les études sur la G-6-P D et ses mutations ont abouti à un approfondissement fondamental dans le domaine de la génétique d'une part : la G-6-P D constitue en effet un marqueur génétique lié au chromosome X particulièrement intéressant puisqu'il est de type biochimique et qu'il ouvre la voie à l'étude de l'expression génétique de ces marqueurs ; dans le domaine de la biologie moléculaire aussi, avec par exemple l'étude de la mutation Hektoen, variété rare rencontrée chez les blancs américains : elle donne lieu à un enzyme hyperactif qui pose le problème d'une mutation structurale à répercussion sur le taux de synthèse de l'enzyme ; dans le domaine des études sur l'Evolution enfin : avantage sélectif éventuel des déficients, variabilité de la séquence des acides aminés le long de la protéine, fixité interspécifique des divers sites fonctionnels de la molécule etc...

Après une courte présentation générale de la G-6-P D, suivie de la liste, avec leurs caractéristiques, des mutants actuellement connus, nous avons apporté notre contribution à l'étude de ce sujet foisonnant de la manière suivante :

. Dans une première partie nous exposons les techniques que nous connaissons plus particulièrement pour les avoir utilisées en Côte d'Ivoire pour le dépistage des différents types électrophorétiques de la G-6-P D et des défi-

cients en cet enzyme. En fin de chapitre nous mentionnons d'autres techniques utilisables dont nous ne donnerons que les principes et les résultats attendus.

. Un deuxième chapitre concernera les résultats obtenus en Côte d'Ivoire ; ils portent d'une part sur un échantillon de malades que l'on soupçonne atteints d'une anémie hémolytique, et d'autre part sur un groupe, tiré au hasard, de femmes au cours de la grossesse ou après l'accouchement ; ce dernier groupe représente de plus près la population générale des femmes de ce pays. Dans un seul cas seulement nous avons pu détailler les résultats de la population globale pour les répartir selon l'ethnie d'origine des sujets. En conclusion les chiffres ivoiriens seront comparés aux statistiques antérieures obtenues sur d'autres populations africaines et sur les populations afro-américaines des U.S.A.

. La troisième partie comportera l'analyse de quelques points fondamentaux apparus à l'occasion de cette statistique ivoirienne :

- Régulation in vivo de l'activité de la G-6-P D érythrocytaire

- Problème de l'inactivation du chromosome X chez la femme

- La G-6-P D dans l'Evolution.

PRESENTATION GENERALE DE LA G-6-P D

(d'après 2)

-:-

. Biochimie

La G-6-P D est un enzyme clé dans le métabolisme de l'érythrocyte puisqu'il constitue la première étape de la voie oxydative des hexoses phosphates et qu'en l'absence de cycle citrique dans cette cellule, cette voie qui conduit essentiellement à la réduction du NADP en NADPH, est ainsi primordiale. Le NADPH a en effet une fonction essentielle : celle de maintenir la glutation à l'état réduit ; le glutation réduit de son côté paraît nécessaire au maintien dans leur intégrité des groupes -SH à l'intérieur et probablement sur la surface du globule rouge ; de plus il pourrait jouer un rôle important dans le catabolisme de l'eau oxygénée dans l'érythrocyte.

Nous présentons un schéma simplifié de la voie oxydative des hexoses phosphates :

Glucose-6-Phosphate

↑↓ NADP → NADPH

GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASE

6 Phosphogluconolactone

↑↓ H_2O

LACTONASE

6 Phosphogluconate

↑↓ NADP → NADPH

PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE

D Ribulose 5 Phosphate + CO_2

RIBOSE 5 P ISOMERASE

RIBULOSE P 3 EPIMERASE

D Ribose 5 Phosphate

D Xylulose 5 Phosphate

+

TRANSCETOLASE

D Sédoheptulose 7 Phosphate + D Glycéraldéhyde 3 Phosphate

TRANSALDOLASE

D Fructose 6 Phosphate + D Erythrose 4 Phosphate

D Erythrose 4 Phosphate + Xylulose 5 Phosphate

TRANSCETOLASE

D Fructose 6 Phosphate + Triose 3 Phosphate

. Génétique

La déficience en G-6-P D (ou toute autre mutation) est transmise génétiquement comme un trait lié au chromosome X. Les hommes qui portent l'allèle l'expriment totalement, et la transmission d'homme à homme n'est jamais observée. D'après l'hypothèse de Mary LYON (48) chez les femmes, seul un des deux gènes est actif dans chaque cellule ; de ce fait la population des globules rouges des femmes hétérozygotes est composée d'une mosaïque de cellules normales et de cellules variantes (Cf. Chapitre III).

. Répartition mondiale des variants de la G-6-P D

- On estime à 100 000 000 le nombre des déficients dans la population humaine.

- Grossiérement, on trouve la déficience sévère (avec mobilité électrophorétique normale) dans les populations du Bassin Méditerranéen, du Moyen et Extrême Orient, alors que la déficience légère (avec mobilité électrophorétique de type A) se rencontre uniquement dans les populations africaines. Mais existent aussi des mutants très rares avec ou sans déficience enzymatique et une mobilité électrophorétique anormale que l'on trouve dans toutes les régions du globe.

- L'observation de la variante A+ ainsi que les études des corrélations entre jumeaux en ce qui concerne l'activité enzymatique précise dans le cas de l'allèle B+, tendent à montrer qu'il existerait plusieurs isoallèles des gènes normaux, même dans des populations relativement homogènes.

- Le fait que seulement quelques variantes de la G-6-P D aient atteint une fréquence appréciable suggère que des mécanismes sélectifs ont pu opérer dans le maintien du polymorphisme observé sur le locus de la G-6-P D ; il semble que le facteur écologique responsable de la sélection des variantes méditerranéenne et africaine soit le paludisme à falciparum : une preuve indirecte à cela réside dans le lien positif que l'on observe entre la distribution de la déficience et celle de la maladie parasitaire.

. Les pages suivantes présentent la liste des mutants de la G-6-P D actuellement connus, avec leurs caractéristiques particulières (40).

T A B L E A U X

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal)	Electro-Phoretic Mobility (% of normal)	K_m G6P (μm)
Normal	B	Various	100	100	50-70
SEVERE ENZYME DEFICIENCY ASSOCIATED WITH					
I.	Ohio	Italian	2-16	110 (Tris-glycine)	Slightly increas.
	Torrance	U.S.	2.4	103 (Ph)	48-60
	Bat-Yam	Iraqui Jewish	0	100 (TEB)	27
	Albuquer-que	U.S. White	1	100 (TEB, Tris, Ph)	115
	Bangkok	Thai	5	100 (TEB, Tris, Ph)	60
	Oklahoma	West Europe	4-10	100 (Tris)	127-200
	Duarte	U.S. White	8.5	100 (TEB, Tris, Ph)	58
	Hong Kong	Chinese	0-15	100 (TEB, pH 8.0)	½ norm.
	Chicago	West Europe	9-26	100 (Tris)	58-76

K_m NADP (μ m)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or comment
2.9-4.4	< 4	55-60	Normal	Normal (Trunc)	Usual
CHRONIC NON-SPHEROCYTIC HEMOLYTIC ANEMIA					
Slightly increas.	< 4		Very low		Rare
2.4			Very low	8-8.5	Reversibly inactived at pH3
	40-45		Very low	Biphasic	Rare
11	0		Very low	Sharp peak at 8.5	Rare
5.3	8.4		Very low	8-8.5	
20	< 4		Low	Narrow peak at 8.2	Rare
5	5.4		Very low	7.0	Rare
normal	Slightly increased		Norm.	normal	
3.1-3.7	< 4		Very low	normal	Rare

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
I. (Cont.)	SEVERE ENZYME DEFICIENCY ASSOCIATED			
	Tripler	U.S. White	35	97 (TEB) 97 (Tris) 90 (Ph)
	Alhambra	Finnish Swedish	9-20	96 (TEB) 95 (Tris) 85 (Ph)
	Milwaukee	Puerto Rican White	0.5	92 (Tris)
	Ramat-Gan	Iraqui Jew	0	90-92(TEB)
	Ashdod	Jew N.Africa	10	90-92(TEB)
	Freiburg	German	10-20	85(TEB) 90(Ph)
	Worcester	U.S. White	0	86 (TEB, pH 7.6) 70 (TEB, pH 9.1 Cellulose acetate)
	"Beaujon"	French	0	Fast(Acrylamide-Tris-glycine pH 8.6)
	"Clichy"	Greek	2	100 (Acrylamide-Tris-glycine, pH 8.6)

K_m G6P (μ m)	K_m NADP (μ m)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or comment
WITH CHRONIC-SPHEROCYTIC HEMOLYTIC ANEMIA(Continued)						
30		3.7	62.4	Very low	Slightly biphasic	
55	2.6	2		Low	Rare	
224		3.7			8.0	Rare
35		40		Very low	Biphasic	Rare
100		40		Slightly low	Biphasic	Rare
87-118	4				Biphasic	Rare
11.2	61	< 2	21	Very low	Sharp peak at 8.0	
182					Peak at 9.5	Rare
178					Abnormal plateau 9-10	Rare

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
II. (Cont.)	SEVERE ENZYME DEFICIENCY ASSOCIATED WITH			
	"Strasbourg"	French	6	100 (Cellulose acetate pH 8.6)
	"Paris"	West Europe	4	?

SEVERE ENZYME DEFICIENCY ASSOCIATED WITH

III. The following G6PD variants of this group have warrant their inclusion in the tabulation :

IV. The following G6PD variants of this group have of the variants given in the table : Nashville 2,

I.	Hualien-Chi	Taiwan	1	110 (Tris) 120 (Ph)
	San Juan	Puerto Rican	10	110 (Tris) 105 (Ph)
	Markham	New Guinea	1.5-10	105-108 (Tris)
	Taiwan-Hakka	Hakka-Chinese	2-9	110 (Ph) 105 (Tris)
	Union	Philippino	< 3	107 (TEB, Ph)

K_m G6P (μm)	K_m NADP (μm)	2-d G6P Util. (% of G6P)	Deamino NADP Util.	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or comment
CHRONIC-SPHEROCYTIC HEMOLYTIC ANEMIA (Continued)						
96	13			Low	Peak at pH 9.0	
280				Very low	Sharp at 9.5	Rare
CHRONIC SPHEROCYTIC HEMOLYTIC ANEMIA (Continued)						
been described, but insufficient data have been given to Eyssen, Fulham, Nashville 1, Berlin.						
been characterized, but they seem to be identical to one similar to Chicago.						
10.1	42			Normal	Biphasic (6.28-10.0)	
16.2 ±0.7		21.6		Very low	Diphasic (7 & 9.5)	Rare
4.4-6.3		162-222		Low	Biphasic	Common Uses NAD as cofactor
10.7-12.2		9.8-21.1		Normal to sl. low	Biphasic (7.0 & 9.5-10.0	Common Uses NAD as co-factor
8-12	3.6-5.2	180	400	Low	Very biphasic (5.5 & 9.0)	Common Does not use NAD as co-factor

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
1. (Cont.)			SEVERE ENZYME	
	Teheran	Iran	<1	100 (Tris) 110 (Ph)
	Hualien	Taiwan	0	105 (Tris)
	Indonesia	Indonesia	< 5	100 (Tris)
	Camplelipur	Pakistani	2-7	100 (Tris) 100 (Ph)
	Mediterranean	Greeks Sardinians Sephardic Jews Jews Asiatic Indians Asian, NW. Ind.	0-7	100 (TEB, Tris, Ph)
	Corinth	Greeks Mediterraneans S.E. Asia	0-7	100 (TEB, Tris, Ph)
	Panay	Philippino	5	96 (Tris, Ph)
	Orchomenos	Greeks	0-7	92-94(Ph) 100 (TEB, Tris)

K_m G6P (μ m)	K_m NADP (μ m)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or comment
DEFICIENCY (Continued)						
46.8		< 4		Normal	Biphasic (5.5 & 10.0)	
8.7		72.2		Very low	Biphasic (6.5 & 9.75)	
25-52	4-9			Normal to sligh. low	Slightly biphasic	
11.4-13.9		5.6-16.4		Very low	biphas. (7.5 & 9.5)	Common, 2% in this population
19-26	1.2-1.6	23-27	350	Low	Biphas.	Common; sometimes assoc.w/ favism or NSHA; maybe heterogenous (see below)
19-26	1.2-1.6	23-27	55-60	Low	Biphas.	May be common
30	4.7	Normal		Slightly low	Biphasic	May be common
11	2.1	105	350		Biphasic	

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell enzyme activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
1. (Cont.)			SEVERE ENZYME	
	Lifta	Iraqui Jew	0	87-90 (TEB)
	Carswell	Irish	10	78 (TEB) 92 (Tris) 78 (Ph)
II.	"Taiwan-Ami 6"	Taiwanese	1	105 (Tris) 110 (Ph)
	"Taiwan-Ami 5"	Taiwanese	0	105 (Tris)
	"Zahringen"	German	1-4	105 (Ph)

III. The following G6PD variants of this group have been described, but insufficient data

IV. The following G6PD variants of this group have been characterized, but they seem to be identical to one of the variants given in the table : Athens-like, similar to Athens ; "U-M", similar to Markham or Union; Taiwan-Ami 1, similar to Markham or Union ; Taiwan-Ami 2, similar to Taiwan-Hakka ; Johnstown,

K_m G6P (μm)	K_m NADP (μm)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or comment
DEFICIENCY (Continued)						
25		60		Very low	No clear optimum	Rare
44	6.4	3.5		Normal	Normal or slightly displaced	Rare
30.2		29.0		Very low	Biphasic (6.5 & 10.0)	
35.3		52.8			Biphasic (7.0 & 9.5)	
28	4.7	30		Low	7.5 & 8.5	Rare. Assoc. with Favism; similar to San Juan

have been given to warrant their inclusion in the tabulation: Sao Paulo 3 ; Joliet 3.

similar to A-; Panay like, similar to Panay ; El Morro , similar to Mediterranean ; New Guinea II, similar to Mediterranean ; Hong Kong 2 , similar to Canton ; Singapour, similar to Canton ; Joliet 1, similar to Columbus.

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell enzyme activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
1.			MODERATE TO MILD	
	Barbieri	Italian	24-40	135 (Tris, pH 7.6)
	Puerto Rico	Puerto Rican	38	112 (Tris)
	A-	Negro	8-20	110 (TEB, Tris,)115 (PO_4)
	Debrousse (formerly Constantine)	Arab	20	113 (Ph) 110 (Tris)
	Taipei-Hakka	Chinese	6-9	105 (Tris) 110 (Ph)
	Kabyle	Algerian	14-36	104 (TEB) 110 (Ph)
	Chibuto	Negro Bantu	20	108 (TEB) 109 (Ph)
	Melissa	Greeks	25	107 (TEB) 105 (Tris) 105 (Ph)
	Canton	South Chinese	4-24	105 (Tris) 105 (Ph)

K_m G6P (μ m)	K_m NADP (μ m)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency Or Comment
ENZYME DEFICIENCY						
Increased	Increased			Normal		Rare
18.6		2.7		Slightly low	Normal	Rare
Normal	Normal	< 4	50-60	Normal	Normal	Common
19-29	1.9-3.3	4-11		Normal	Normal	Common
27.7-43.4	3.3-5.4			Slightly low	Truncate (9.75-10.0)	
68		Normal		Normal	Normal	
30	8.2	< 4		Slightly low	Normal	Rare
18.1 22.0	3.1-3.7	3.7	59-65	Truncate		
17.7-38.3		1.2-20.8		Low	Biphasic (6.5-7.0 & 9-9.5)	May be heterogenous

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal)	Electrophoretic mobility (% of normal)
I. (cont.)			MODERATE TO MILD ENZYME	
	Columbus	Negro	36	100 (Tris)
	Athens	Greeks	20-25	98 (TEB)
	Washington	Negro	16-23	95 (Tris)
	Benevento	Italian	13	93 (Tris)
	West Bengal	Asiatic Indian	9	90 (TEB) 82 (Tris)
	Mexico	Mexican	10-22	85-88 (TEB) 91 (Tris) 90 (Ph)
	Seattle	Welsh Scottish	8-21	80 (TEB) 90 (Tris)
	Kerala	Asiatic, S.E. Indian	50	75 (TEB) 90 (Tris)
	Tel Hashomer	Tunisian Jew	25-40	60-70 (TEB)

K_m G6P (μm)	K_m NADP (μm)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or Comment
DEFICIENCY (Continued)						
Normal	Normal	Normal				Rare
16-19	2.5-6.5	10-15	126	Slightly low	Slightly biphasic	Common
49-57.4		1.6		Normal	Normal	
4.6			245	Low	Biphasic (5.5 & 9.75)	
31	6.6	4		Normal	Normal	Rare
32-40	2-3	26-33	130-160		Truncate	
15-25	2.4-2.8	7-11		Normal		Rare
23	1.5	7.4		Normal	Biphasic	Rare
30-40		Normal		Normal	Slightly biphasic	Rare

Class and Group	Variant (references)	Population Origin	Red Cell Enzyme Activity (% of normal	Electrophoretic mobility (% of normal)
1. (Cont.)			MODERATE TO MILD	
	Capetown	Cape Colored Norwegian	53-80	55-65 (TEB) 76-88 (Tris) 35-48 (Ph)
	Port-Royal	Sicilian	50-75	85 (TEB)
II.	"Attica"	Greece	50	105 (Cellogel, pH 7.5)
III.	The following G6PD variants of this group have been described, but insufficient data have been given to warrant their			
IV.	The following G6PD variants of this group have been characterized, but seem to be identical to one of the variants given			
I.			VERY MILD OR NO	
	Inhambane	African Bantu	100	112 (TEB) 115 (Ph)
	Steilacoom	Negro	100	>110 (TEB) 107 (Ph)
	A +	Negro	80-100	110 (TEB, Tris) 115 (Ph)

K_m G6P (μm)	K_m NADP (μm)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or Comment
ENZYME DEFICIENCY (Continued)						
11-14	0.2-1	7-16		Normal	Biphasic	
20		7.5	10	Low		Probably rare
40.7	4.7	1.8		Normal	Normal	

inclusion in the tabulation : Madison ; Andra Pradesh ; Sao Paulo ; Joliet 2.

in the table : Loyola (D-), identical to Seattle ; and Seattle-like.

ENZYME DEFICIENCY						
38	4.7	< 4		Normal	Slightly biphasic	Rare
62	3	< 4		Normal	Normal	
Normal	Normal	< 4	50-60	Normal	Normal	Common

Class and Group	Variant (references)	Population Origin	Red Cell enzyme activity (% of normal	Electrophoretic mobility (% of normal)
	Levadia	Greeks	100	107 (TEB) 104 (Tris) 108 (Ph)
	Lourenzo Marques	African Bantu	100	106 (TEB) 106 (Ph)
	King County	Negro	100	105 (TEB)
	Thessaly	Greeks	100-110	98 (TEB) 105 (Tris) 98 (Ph)
	Karditsa	Greeks	85	95(TEB, Tris)91-92 (Ph)
	Western	Greeks	60	95 (TEB, Ph)
	Manjacaze	African Bantu	100	90 (TEB) 90 (Ph)
	Baltimore Austin	Negro	75	90 (Tris)
	Ijebu-Ode	Negro	100	85 (TEB)
	Minas Gerais	Brazilian	> 70	82 (Ph)

K_m G6P (μ m)	K_m NADP (μ m)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or Comment
40.6	3.5	2.6	60		Normal	
66	4.3	<4		Normal	Normal	Rare
61	4	6			Normal	Rare
28.5	12.3	9.7	70		Normal	
24.7	6.5	6.5	52.4		Normal	
38	2.2	3.6	42		Normal	
141	3.8	< 4		Normal	Normal	Rare
65	3.1	< 4		Normal	Normal	Rare
60	24			Low	Biphasic	Rare
41	4	9			Normal	Rare

Class and Group	Variant (References)	Population Origin	Red Cell enzyme activity (% of normal	Electrophoretic mobility (% of normal)
I. (Cont.)			VERY MILD OR NO	
	Tacoma	Negro	100	94 (TEB) 80-82 (Ph)
	Madrona	Negro	70-80	80 (Ph)
	Ibadan-Austin	Negro	72	80 (Tris)
	Ita-Bala	Negro	100	65 (TEB)
I.			INCREASED ENZYME	
	Hektoen	U.S. White	400	100 (TEB, Tris) 120 (Ph, pH 6.5)

III. The following G6PD variants of this group have been described, but insufficient data have been given to warrant their inclusion in the tabulation : Hartford.

K_m G6P (μm)	K_m NADP (μm)	2-d G6P Utilization (% of G6P)	Deamino NADP Utilization	Heat Stability	pH Optima	Population Frequency or Comment
ENZYME DEFICIENCY (Continued)						
66	4	2.6	69		Normal	Can be distinguished from Ibadan Austin, Madrona & Minas Gerais by side-by-side comparison
32	3.5	Normal			Normal	Rare
62-72	3.3	< 4		Normal	Normal	Rare
91	11			Slightly low	Normal	Rare
ACTIVITY						
51	3.0	3	44	Normal	Normal	Rare

I - TECHNIQUES

-:-

A) Recherche des déficients

- Test de Motulsky et Campbell-Kraut (1) (2)

. Principe

Il consiste à observer au cours du temps sur un hémolysat additionné de NADP et de G-6-P, la décoloration du Bleu de Crésyl brillant par le NADPH produit par l'action de la G-6-P D. Le colorant ici a deux fonctions : il sert d'indicateur de l'apparition du NADPH et en même temps il stimule la voie des pentoses.

. Technique

La technique que nous avons employée utilise des produits prêts à l'emploi (Sigma kit for G-6-P D) qui permettent une recherche rapide des déficients et qui ne prêtent pas aux difficultés d'interprétation des résultats selon la provenance du colorant utilisé. Néanmoins nous donnons ici la procédure générale dans ses détails.

Ajouter 0,02 ml de sang total (sang capillaire ou sang prélevé sur ACD) à 1,00 ml d'eau distillée.

Les réactifs sont :
0,1 ml de G-6-P de sodium (825 mg/100 ml)
0,1 ml de NADP (50 mg/100 ml)
0,25 ml de Bleu de Crésyl brillant (32 mg/100)
0,2 ml de tampon Tris (pH 8,5): 8,96 mg/97 ml
+ 3 ml HCl concentré

Mélanger en roulant le tube entre les paumes des mains. Couler de l'huile au-dessus du mélange pour empêcher le contact avec l'air. Incuber à 37° C dans un bain-marie.

Examiner les tubes toutes les 5 ou 10 mn après les 40 premières minutes ; noter le temps de décoloration, qui correspond à la disparition de la couleur bleue de la solution et l'apparition de la couleur rouge de l'hémoglobine. Les échantillons normaux sont normalement décolorés à la 65e minute.

On peut résumer les résultats possibles en Afrique dans le tableau I-1.

	20 mn	100 mn	6 heures
Normal	décoloration partielle	décoloration complète	décoloration complète
Déficience partielle	coloration inchangée	décoloration partielle	décoloration complète
Déficience totale	coloration inchangée	coloration inchangée	coloration inchangée

Tableau I-1

. Remarques (2)

- La relation entre le taux d'enzyme déterminé quantitativement et le temps de décoloration n'est pas linéaire et l'on ne note que de faibles différences dans le temps de décoloration si l'enzyme est réduit jusqu'à 40 % du taux normal.

- La baisse de l'hématocrite jusqu'à 40 p.cent du chiffre normal ne va pas de pair avec une prolongation significative du temps de décoloration.

- Test de réduction de la méthémoglobine. Test de Brewer et coll. (3) (2)

. Principe

Il consiste à observer sur un échantillon de globules rouges soumis à l'action d'un oxydant, la réduction de la méthémoglobine, réduction qui se fait principalement par la voie des pentoses ; de ce fait le taux de réduction est proportionnel à l'activité en G-6-P D de la cellule. Le test utilise en outre le Bleu de Méthylène, colorant dont la fonction ici n'est pas de servir d'indicateur de la réaction, mais d'apporter un maillon d'oxydo-réduction nécessaire à l'obtention d'une réaction optimum.

. Technique

- Réactifs

. Solution I : 1,25 g de nitrite de sodium + 5,0 g de glucose pour 100 ml final d'eau distillée.

. Solution II : 0,15 g de chlorure de Bleu de Méthylène trihydraté pour 1000 ml final d'eau distillée.

- Préparation des tubes

. Tube test : 0,1 ml de la solution I + 0,1 ml de la solution II

. Tube de référence positif : 0,1 ml de la solution I.

. Tube de référence normal : aucun réactif dans ce tube.

Les trois tubes précédents peuvent être utilisés immédiatement ou bien subir une évaporation complète et être utilisés secs dans les 6 mois qui suivent au moins.

- Manipulation

Ajouter 2,0 ml de sang total (sang à utiliser dans les 36 heures si prélèvement sur ACD) dans chacun des trois tubes. (Si plusieurs échantillons de sang sont à tester simultanément, on peut utiliser un seul tube de référence positif, mais il nous semble que chaque échantillon de sang doit avoir son tube de référence normal particulier : cela évitera les erreurs de lecture dans le cas d'une anémie passée inaperçue. En effet si l'hématocrite est à 30 p. cent ou moins, il est nécessaire d'amener le volume des cellules tassées à 40 p.cent ± 5 p. cent en retranchant une quantité adéquate de plasma).

Bien mélanger, incuber à 37°C pendant 3 heures sans remuer. Puis ajouter 0,1 ml du mélange test à 10 ml d'eau. 2 à 10 mn plus tard, comparer visuellement la couleur avec celle des tubes de référence.

- Interprétation

Le tableau I-2 donne les différents résultats possibles.

Normal	Couleur rouge clair comme le tube de référence normal
Déficience totale	Couleur marron comme le tube de référence positif
Déficience partielle	Variation de la couleur entre le rouge et le marron

Tableau I-2

- Autres tests

. Test de Kleihauer & Betke (4) (5)

. Principe

L'activité peroxydasique du pigment des hématies peut être inhibée par le cyanure lorsqu'il est sous forme de méthémoglobine. Le test permet de révéler le taux de méthémoglobine dans le sang. Puisque les hématies déficientes en G-6-P D se méthémoglobinisent facilement, on a là un moyen rapide et facile de mettre en évidence le défaut et de le mesurer par la fréquence des hématies déficientes.

. Résultats

Les cellules contenant de l'oxyhémoglobine - donc non déficientes - apparaissent colorées en rouge vif.

Celles qui renferment de la méthémoglobine ne sont représentées que par leur stroma et apparaissent incolores.

En principe toutes les cellules sont colorées

dans un sang normal. Dans un sang déficient en G-6-P D, le nombre des cellules non colorées est proportionnel au degré de déficience.

. "Spot test" de Fairbanks & Beutler (6)(2)

. Principe

La réduction du NADP par la G-6-P D est relayée par la réduction du MTT, un composé soluble du tétrazolium, en un dérivé formazan insoluble pourpre. Comme le colorant réagit avec l'hémoglobine de manière non spécifique, le pigment est séparé de la G-6-P D par élution à partir d'un papier DEAE.

. Interprétation

Les échantillons normaux donnent une couleur pourpre foncée. Les sangs totalement déficients du type A - donnent une très faible coloration. Les hétérozygotes sont souvent détectées par les colorations intermédiaires variées qu'elles présentent.

. Dosage de la G-6-P D dans l'hémolysat (2)

B) Recherche des types électrophorétiques

- Electrophorèse sur acétate de cellulose ou sur "cellogel" (d'ap. 7)

On prépare l'hémolysat du sang à tester (prélevé sur anticoagulant ACD) par la méthode à la saponine ou à la digitonine. (A utiliser de préférence dans les trois jours après l'hémolyse).

. Migration

On utilise dans les compartiments de la cuve une solution contenant 0,136 M Tris, 0,004 M EDTA, et 0,015 M d'acide borique, avec un pH fi-

nal de 9,1. On imprègne les bandes d'acétate de cellulose ou de "cellogel" dans cette dernière solution additionnée de 5 mg de NADP pour 100 ml ; les bandes sont essorées modérément entre deux buvards et appliquées sur la cuve. Environ 2 microlitres d'hémolysat y sont déposés à l'aide d'une micropipette. La migration vers l'anode dure 1 heure à 450 volts.

. Coloration

Elle se fait immédiatement après la migration avec le mélange extemporané dans les proportions 12:1, des deux solutions suivantes :

Solution I : pour 10 ml de tampon 0,1 Tris-HCl pH 8
4 mg de NADP
10 mg de G-6-P (sel de Na)
2 mg de MTT

Solution II : pour 1 ml d'eau distillée
1 mg de phénazine méthosulfate

Ce mélange est imprégné sur une demi bande d'acétate de cellulose qui est ensuite essorée très légèrement entre deux buvards et placée sur une plaque de verre contenue dans une boîte humide. La bande de migration est déposée sur cette bande de coloration ; la boîte est fermée et on laisse à l'obscurité pendant 15-30 minutes.

. Résultats

Une bande bleue apparaît là où l'activité G-6-P D est présente, au-delà de la bande de l'hémoglobine A.

- Autres supports d'électrophorèse : gel d'amidon (2)

La technique de préparation du gel est issue de celle de SMITHIES (8) en utilisant un amidon déjà hydrolysé (CONNAUGHT). Plusieurs solutions tampons sont utilisables : tampon Tris-HCl (9), tampon EDTA-acide borique-Tris (10), tampon phosphate (11). Les solutions de coloration sont identiques à celles utilisées dans la migration sur acétate de cellulose ou sur "cellogel".

Groupes ethniques et principales ethnies de Côte d'Ivoire

II - RESULTATS EN COTE D'IVOIRE ET COMMENTAIRES

-:-

A) Déficience en G-6-P D

Le tableau II-1 donne la proportion de déficients en G-6-P D trouvés à l'aide du test de Motulsky dans la population des malades (cf. l'introduction) répartis selon le sexe.

		Normaux	Déficients partiels	Déficients totaux	Total
Femmes	effectifs	142	38	32	212
	% Total	67	18	15	100
Hommes	effectifs	177	42	59	278
	% Total	64	15	21	100

Tableau II-1 (Malades, Test de Mot.)

Le tableau II-2 concerne les déficients obtenus à l'aide du même test, parmi les femmes reçues en consultation prénatale ou en salle d'accouchement.

	Normales	Déficientes partielles	Déficientes totales	Total
effectifs	199	14	7	219
% Total	90,5	6,3	3,2	100

Tableau II-2 (Femmes enceintes ou accouchées Test de Mot.)

Cette dernière statistique, qui se rapproche le plus d'une étude sur la population des femmes normales, montre qu'il y a deux fois plus de déficientes partielles que de déficientes totales au test de Motulsky, la proportion globale des déficients étant de 9,5 p.cent. Le tableau II-1 montre un biais statistique en faveur des femmes déficientes totales, en accord avec la notion d'une pathologie plus fréquente chez ces sujets que chez les déficientes partielles.

Le problème qui se pose est celui de la signification génétique des déficients partiels chez les hommes malades. Ces sujets ont-ils une G-6-P D normale, non mutante (A+ ou B+) et présentent-ils une déficience pour quelque raison physiopathologique ; ou s'agit-il d'une G-6-P D anormale à expression partielle ? Dans ce dernier cas, la fréquence du gène déficient serait d'environ 35 p.cent dans la population des hommes malades, chiffre en assez bon accord avec la fréquence de déficients totaux dans la population des femmes malades.

Une population d'hommes donneurs de sang, répartie selon l'ethnie d'origine des sujets, a été étudiée par le test de Motulsky. Les résultats sont présentés au tableau II-3.

	Normaux	Déficients partiels	Déficients totaux
Attié	26	10 (26,3%)	2 (5,2%)
Baoulé	125	20 (12,9%)	9 (5,8%)
Agni	34	6 (14,2%)	2 (4,7%)
Dioula	26	4 (12,5%)	1 (3,1%)
Bété	181	23 (10,9%)	6 (2,8%)
Wobé	80	5 (5,7%)	2 (2,2%)
Guéré	43	1 (2,2%)	0 (0 %)

Tableau II-3 (Donneurs de sang. Test de Motulsky)

Nous avons rapproché les ethnies apparentées. Les Baoulé et les Agni forment le groupe des Akans auxquels on rattache généralement les Attié, malgré l'avis contraire de certains auteurs. Les Attié montrent un très grand pourcentage de déficients, alors que les Baoulé et les Agni présentent deux fois moins de déficients partiels que les Attié. Bété, Wobé et Guéré font partie du groupe Krou. Wobé et Guéré ont un taux faible de déficients, tandis que les Bété montrent un pourcentage voisin de celui observé chez les Baoulé et les Agni. Quant aux Dioula, membre du groupe des Manding, on trouve des chiffres similaires à ceux des Baoulé, Agni et Bété.

Le tableau II-4 présente les résultats obtenus par le test de Brewer sur la population des

femmes au cours de la grossesse ou après l'accouchement.

	Normales	Déficientes partielles	Déficientes totales	Total
effectifs	83	36	25	144
% Total	57,6	25,0	17,4	100

Tableau II-4 (Femmes enceintes ou accouchées Test de Brewer)

Le test de Brewer révèle une proportion bien plus importante de déficients (42,4 p.cent) qu'au test de Motulsky (9,5 p.cent). Certains auteurs (STAMATOYANNOPOULOS et Coll. (dont MOTULSKY lui-même) (12)) ont montré que le test de réduction de la méthémoglobine de Brewer est plus sensible que le dosage de la G-6-P D et le test de Motulsky pour ce qui est de la détection des femmes hétérozygotes prouvées génétiquement. Néanmoins nous ne pensons pas que cela puisse expliquer de façon satisfaisante la divergence entre les deux tests constatée ici ; en effet, en plus de l'augmentation, au test de Brewer, des déficientes partielles, il existe une plus grande augmentation encore des déficientes totales. L'hypothèse que nous favorisons est la suivante : le test de Brewer est beaucoup moins spécifique que celui de Motulsky. Il est sensible à toute anomalie existant dans la chaîne métabolique allant de la formation du NADPH à la réduction de la méthémoglobine. De ce fait, il se pourrait que l'excès de déficients obtenu provienne d'un défaut à un autre niveau que celui de la G-6-P D, ce défaut ayant pu être sélectionné génétiquement.

B) Les phénotypes électrophorétiques

Le tableau II-5 donne la fréquence des phénotypes électrophorétiques A et B dans la population des hommes malades.

	Bande A	Bande B	Absence de bande	Total
effectifs	19	49	15	83
% Total	22,8	59,0	18,2	100

Tableau II-5 (Hommes malades)

Si l'absence de bande à l'électrophorèse équivaut à une déficience totale au test de Motulsky et au génotype A- (la mutation B- n'étant pas rencontrée dans les populations noires), on peut tenter d'interpréter génétiquement les chiffres trouvés de la manière suivante : A+ = 22,8 p.cent, B+ = 59,0 p.cent, A- = 18,2 p.cent. Néanmoins il n'est pas impossible que les A+ soient ainsi surévaluer aux dépens des A-, ce que laisseraient supposer d'une part la comparaison de ces résultats avec ceux du test de Motulsky (problème des déficients partiels chez les hommes), et d'autre part la constatation assez fréquente d'une bande A très faiblement colorée.

La fréquence des différents phénotypes électrophorétiques chez les femmes malades d'une part, et chez les femmes au cours de la grossesse ou après l'accouchement d'autre part, est consignée sur le tableau II-6.

		Bande A	Bande B	Bande A & Bande B	Absence de bande	Total
Femmes malades	effectifs	5	31	10	9	55
	% Total	9,1	56,3	18,2	16,4	100
Femmes enceintes ou accouchées	effectifs	19	78	12	16	125
	% Total	15,2	62,4	9,6	12,8	100

Tableau II-6

Pour les femmes malades ainsi que les hommes malades, l'absence de phénotype à l'électrophorèse a une fréquence en accord avec celle des déficients totaux au test de Motulsky.

Le phénotype "bande A et bande B" peut correspondre (cf. la remarque plus haut) aux génotypes A+B+ et A-B+, et le phénotype "bande B", aux génotypes B+ et A-B+ (éventuellement A+B+). Une explication possible de la différence observée dans la fréquence de ces deux phénotypes dans la population des femmes malades d'une part et des femmes au cours de la grossesse ou après l'accouchement, de l'autre, résiderait dans le fait que les hématies des sujets malades auraient tendance à être plus jeunes que celles des sujets sains et donc à mieux mettre en évidence, avec la technique utilisée, une bande A- ; ainsi le génotype A-B+ se retrouverait plus fréquemment dans la

classe phénotypique "bande A et bande B" chez les femmes malades. De même cette hypothèse pourrait expliquer la découverte, dans la population des femmes enceintes ou après l'accouchement, d'un plus grand nombre de sujets de phénotype "absence de bande", comparé au chiffre de déficientes totales donné par le test de Motulsky pour cette population.

C) Comparaison avec d'autres populations africaines ou afroaméricaines

. Pourcentage des déficients en G-6-P D

Le tableau II-7 indique les pourcentages de déficients en G-6-P D trouvés dans les populations noires de divers pays africains, dans certaines populations afroaméricaines et enfin, à titre indicatif, dans quelques pays africains à majorité arabe ou éthiopienne (d'après 2).

Pays ((Peuple))	% déficients en G-6-P D	Références
Sénégal	5-12 %	(13) (2)
Gambie	12-22 %	(14) (15)
Ghana	24 %	(14)
Nigéria	10-27 %	(31)
((Yoruba))	22 %	(14)(16)(17)(18)(19)(20)
Cameroun	20 %	(21)
République Centre Africaine : ((pygmées babinga)	4 %	(2)
Congo (République Démocratique ou Zaïre)	6-23 %	(22) (23)
((pygmées))	4 %	(1)
Congo (Brazzaville)	cas sporadiques	(1)
Kénya	2-25 %	(24)
Ruanda	2-6 %	(22)
Uguanda	15 %	(24) (25)
Tanzanie	2-28 %	(26)
Burundi	2-6 %	(22)
Angola	17-27 %	(21)
Béchuanaland	3 %	(21)
Swaziland	4 %	(21)
Rhodésie du Sud	4-20 %	(27)
Sud Ouest Africain ((Bushmen))	3-4 %	(21)
Afrique du Sud	3-9 %	(27) (28) (29)
Madagascar	14-16 %	(30)
Noirs des U.S.A.	7-17 %	(23)(31)(32)(33)
Algérie	0-12 %	(34)
Libye	1 %	(34)
Egypte	3,6 %	(35)
Ethiopie	0 %	(36) (37)

Tableau II-7

Grossièrement on constate un pourcentage important de déficients en Afrique Noire, un pourcentage plus faible dans les populations arabes, et aucun déficient dans la population éthiopienne. Dans les populations noires le pourcentage de déficients n'est pas uniforme: il varie de façon importante parfois, d'un pays à l'autre et, à l'intérieur d'une région, d'une ethnie à l'autre. Nous avons rencontré ces variations en Côte d'Ivoire également où les différents chiffres semblent se rapprocher de ceux que l'on trouve dans les pays voisins (en se fondant sur le chiffre des déficientes totales trouvées au test de Motulsky, chiffre que l'on égale à p^2 ; on trouve ainsi la fréquence présumée p des hommes déficients, au test de Motulsky).

. Phénotypes électrophorétiques

Le tableau II-8 donne deux exemples de fréquences des phénotypes électrophorétiques dans la population noire (hommes).

Pays (Peuple)	A-	A+	B+
Nigéria (Yoriba)	22 %	21 %	57 %
U.S.A. (Noirs)	12 %	18 %	70 %

Tableau II-8

Les fréquences trouvées chez les Yoruba du Nigéria sont très proches des chiffres ivoiriens dans la population des hommes malades (il faut néanmoins tenir compte de la remarque faite plus haut pour leur interprétation). Une explication plausible de la plus grande fréquence du phénotype B+ (70 %) chez les noirs

américains par rapport à celle que l'on constate au Nigéria (57 % chez les Yoruba) et en Côte d'Ivoire (59 %) pourrait résider en partie dans le fait que la population afro-américaine a subi un certain métissage avec la population blanche locale, dont le phénotype quasi unique est B+.

-:-

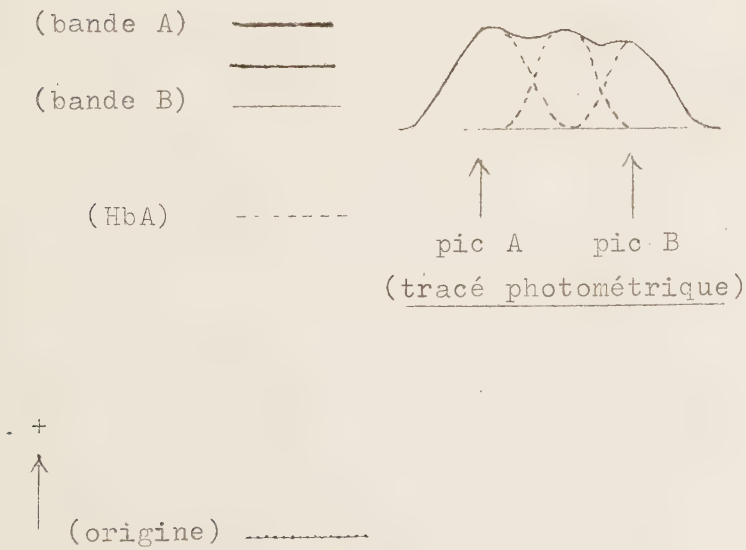
III - ETUDE DE QUELQUES POINTS FONDAMENTAUX

-:-

- Régulation in vivo de la G-6-P D

. Découverte de Phénotypes inhabituels

Au cours de l'électrophorèse sur acétate de cellulose ou sur "cellogel", nous avons rencontré à plusieurs reprises chez des femmes le phénotype inhabituel suivant :



La découverte de 3 bandes, assez étonnante a priori du fait de l'existence d'un locus de la G-6-P D chez l'homme et de deux chez la femme au maximum, nous a conduit à envisager systématiquement toutes les hypothèses.

Hypothèse A : il s'agit de plusieurs cas de trisomie X avec un allèle mutant "Y" nouveau. Deux arguments contre cette hypothèse compliquée :

- S'il existe un nouveau mutant "Y", il devrait se retrouver chez des hommes, comme bande unique ; or on ne l'observe jamais dans la population masculine.

- Nous n'avons pu dans le contexte africain pratiquer des caryotypes chez ces femmes ; cependant du fait de la corrélation établie entre le nombre de chromosomes X et le nombre de corpuscules hyperchromatiques de Barr moins 1, nous avons recherché la proportion de cellules de la muqueuse jugale qui contiennent 2 corpuscules de Barr : aucune n'a été trouvée.

Hypothèse B : il existe un gène autosomique codant pour une G-6-P D mutante. Cette hypothèse soulevée par l'existence connue de G-6-P D codée par un locus situé en dehors du chromosome X s'avère peu probable en raison de la première remarque de l'hypothèse A et n'a de toute façon jamais été décrit pour le globule rouge.

Hypothèse C : il s'agit d'une hybridation moléculaire de type (AB). C'est l'hypothèse la plus séduisante bien qu'elle pose quelques problèmes comme nous le verrons plus loin.

Arguments en faveur de l'hypothèse C :

. argument de simplicité sur le plan génétique : les deux premières hypothèses font intervenir chacune deux événements fort rares et qui auraient tout lieu de survenir indépendamment, alors que nous avons retrouvé assez fréquemment le phénotype (A) (AB) (B).

. La bande intermédiaire est placée à égale distance de la bande (A) et de la bande (B). Cette position est très en faveur d'une hybridation moléculaire. La bande la plus rapide serait composée de deux sous-unités identiques que l'on peut écrire AA, la bande la plus lente serait aussi composée de deux sous-unités identiques entre elles mais différentes de A, soit BB, et la bande intermédiaire serait une association hybride AB. Nous verrons ce qu'il faut en penser à partir des découvertes récentes sur la structure quaternaire de l'enzyme.

. Enfin l'argument décisif vient de la constatation suivante : si juste avant l'hémolyse par la saponine, on ajoute du NADP dans le tube à hémolyse pour donner une concentration finale de 0,005 g p.cent, l'électrophorèse ne révèle plus que les deux bandes (A) et (B), la bande intermédiaire ayant totalement disparu. Comme le NADP, l'un des substrats de l'enzyme n'a certainement pas détruit la molécule correspondant à la bande intermédiaire, on en déduit qu'a été mis en évidence ici un phénomène d'hybridation moléculaire où intervient le NADP.

. Elimination d'une nouvelle mutation du gène codant pour le produit A ou du gène codant pour le produit B

L'hybridation moléculaire pourrait être liée à une mutation du gène de structure A ou B, mutation qui n'aurait aucune répercussion sur la mobilité du produit génique mais qui néanmoins aboutirait à une instabilité de l'association des deux sous-unités AA et/ou BB.

Pour tester cette hypothèse, nous avons pris opportunité du marqueur sexuel que représente le chromosome X sur lequel se trouve le locus de la G-6-P D, et nous avons examiné le phénotype de la mère et de la soeur (issue de même père et même mère) d'une des femmes présentant le phénotype (A) (AB) (B).

La mère a le phénotype (B) et la soeur le phénotype (A). Aucune bande "intermédiaire" n'a été trouvée dans les deux cas.

Nous avons rejeté tout d'abord comme fort peu probable l'hypothèse d'une double mutation sur le gène codant pour A d'une part et sur celui codant pour B de l'autre.

S'il s'agit d'une mutation soit sur le gène A, soit sur le gène B donc, de deux choses l'une : ou la mutation a été transmise par le père, et la soeur de notre sujet l'a reçue également, ou bien la mutation a été transmise par la mère, et la soeur de notre sujet peut ou non l'avoir aussi reçue. Les phénotypes en apparence contradictoires de la mère et de la soeur nous ont fait pratiquer sur ces deux sujets un test de Brewer (le dosage de la G-6-P D ni le test de Motulsky n'étant techniquement possibles). Un résultat partiellement

anormal pour la soeur a été obtenu alors que la mère n'a montré aucune déficience.

Pour interpréter génétiquement ces données on doit tenir compte des deux faits suivants :

- le test de Brewer ne paraît pas détecter exclusivement les déficiences en G-6-P D (cf chapitre II).

- quel que soit le test considéré (Test de Brewer, test de Motulsky, dosage de la G-6-P D), toutes les hétérozygotes de déficience en G-6-P D génétiquement prouvées ne peuvent être détectées. L'hypothèse de Mary LYON (cf.infra) donne une explication de ce fait et permet une approche plus précise et prudente de la relation entre phénotype et génotype pour ce qui est de tout allèle des gènes liés au chromosome X. Dans l'analyse génétique du cas présent, à chaque allèle (soit B+, A+, A- ...) sera associé ou non un indice littéral : lorsque l'allèle, chez la femme considérée n'est pas exprimé de façon appréciable à cause de l'inactivation précoce du chromosome X qui le porte, il sera affecté de l'indice ph f (qui veut dire "phénotypiquement faible"); lorsque son expression sera appréciable, aucun indice ne lui sera affecté.

Deux possibilités sont donc à considérer :

1) La mutation est issue du père :
   - la mère ne la possède pas
   - la soeur la possède mais peut ne pas l'exprimer si chez elle l'allèle mutant est dans la situation ph f.

2) La mutation est issue de la mère :
   (marquons l'allèle mutant par o)

- ou la mère est B^{+o} $B^{+}_{ph\ f}$ et la soeur est A^{+-} $B^{+}_{ph\ f}$ ou A^{+-} $B^{+o}_{ph\ f}$: la mère exprime alors la mutation, mais la soeur, qu'elle possède ou non la mutation, ne l'exprime pas.

- ou la mère est B^{+o} B^{+} et la soeur est A^{+-} $B^{+}_{ph\ f}$ ou A^{+-} $B^{+o}_{ph\ f}$: la mère exprime alors la mutation, mais la soeur, qu'elle possède ou non la mutation, ne l'exprime pas.

- ou la mère est $B^{+o}_{ph\ f}$ B^{+} et la soeur A^{+-} $B^{+}_{ph\ f}$ ou A^{+-} $B^{+o}_{ph\ f}$: la mère possède la mutation mais ne l'exprime pas, et la soeur, qu'elle possède ou non la mutation, ne l'exprime pas.

- ou la mère est B^{+o} $A^{+-}_{ph\ f}$ et la soeur est A^{+-} $B^{+o}_{ph\ f}$ ou A^{+-} $A^{+-}_{(ph\ f)}$: la mère exprime la mutation mais la soeur, qu'elle possède ou non la mutation, ne l'exprime pas.

- ou la mère est B^{+} $A^{+o}_{ph\ f}$ et la soeur est $B^{+}_{ph\ f}$ A^{+o} : la mère possède alors la mutation mais ne l'exprime pas tandis que la soeur possède la mutation (cela nécessairement puisque la femme étudiée de phénotype (A) (AB) (B) aura pour génotype B^{+} A^{+o}) et l'exprime.

En conclusion, s'il est vrai que le phénotype observé (A) (AB) (B) chez la femme considérée est dû à une mutation soit sur le gène A soit sur le gène B, la mère ou la soeur l'exprime, ou aucune des deux, mais de toute façon jamais les deux ensemble.

Pour tenter d'avoir une réponse à cette question, nous avons réalisé la manipulation in vitro suivante : nous avons mélangé en quantité égale l'hémolysat de la mère avec celui d'un sujet A+ non déficient d'un côté, et l'hémolysat de la soeur avec celui d'un sujet B+ non déficient de l'autre. Nous avons recherché qu'elle était le phénotype de ces deux mélanges. Avec chacun des hémolysats des sujets A+ ou B+ non déficients utilisés, nous avons observé :

- 3 heures après la formation de l'hémolysat, que le mélange ait été fait tout de suite après l'hémolyse ou juste avant la migration électrophorétique, seules 2 bandes (A) et (B) sont visibles dans tous les cas.

- 20 heures après, en reprenant les mélanges précédents, on constate l'apparition de 3 bandes (A), (AB), et (B) dans tous les cas.
En mélangeant les hémolysats des sujets A+ et B+ utilisés, dans tous les cas nous avons fait la même constatation que précédemment.

. En conclusion nous pouvons dire que :

. nous avons à faire ici à un phénomène d'hybridation moléculaire.

. cette hybridation n'est pas due à une mutation nouvelle sur l'allèle A ou sur l'allèle B.

. le phénotype (A) (AB) (B) rencontré immédiatement après l'hémolyse chez certaines femmes et pas chez d'autres a pour origine probable une modification fonctionnelle ; cette conclusion étant corroborée par l'apparition de ce phénotype au cours du temps dans les mélanges in vitro d'hémolysats A+ et B+ quels qu'ils soient.

. Autres cas d'hybridation moléculaire de la G-6-P D humaine dans la littérature

YOSHIDA et coll. (37) ont obtenu in vitro, après purification partielle et précipitations répétées par le sulfate d'ammonium, une hybridation moléculaire entre les variantes A+ et B+ d'une part (démontrée par chromatographie) et les variantes A+ et "Seattle" : la dissociation et la réactivation de l'un ou l'autre type de G-6-P D donnent un seul enzyme qui est apparemment identique à l'enzyme natif, et la dissociation et la coréactivation de deux types de G-6-P D produisent l'hybride en plus des deux enzymes originaux.

. Mise en évidence du processus fonctionnel mis en jeu

La constatation chez des sujets génétiquement AB dans les 3 heures après l'hémolyse d'un phénotype électrophorétique (A) (B) ou bien (A) (AB) (B) ne semble pas due à des modifications dans la technique d'hémolyse ; tous les échantillons de sang ont été traités exactement de la même façon ; de plus les mêmes résultats électrophorétiques ont été trouvés chez un même sujet pour tous les hémolysats faits à plusieurs jours d'intervalle ; enfin on ne constate pas de changement dans le type électrophorétique, que l'hémolyse utilise la saponine, la digitonine ou l'eau distillée.

Un facteur non spécifique comme le pH des hémolysats a pu être éliminé : il n'y a pas de différences significatives dans les pH des divers hémolysats.

Il semble que le NADP joue un rôle essentiel dans les deux phénotypes électrophorétiques

observés chez les femmes génétiquement AB. Deux raisons majeures vont à l'appui de cette hypothèse :

. chez les femmes qui présentent le phénotype (A) (AB) (B), l'adjonction de 0,005 g p.cent de NADP juste avant l'hémolyse fait disparaître la bande (AB).(Le NADP ne modifie cependant aucun des autres phénotypes possibles (A), (B) ou (A) (B)).

. YOSHIDA (38) (39) a montré in vitro que le retrait du NADP provoquait la dissociation de la molécule active en un produit de taille deux fois moindre que la molécule originale.

On peut donc tenter d'expliquer à la lumière de ces deux faits l'origine possible des deux phénotypes obtenus (A) (B) et (A) (AB) (B) :

1) chez les femmes (A) (AB) (B) la concentration en NADP de leurs hématies est faible comparée à celle des femmes (A) (B). Aussi assiste-t-on chez elles à une dissociation de leur G-6-P D active, peut-être in vivo (au moins partiellement, cf infra) en tout cas au moment de l'hémolyse, alors qu'elle n'a pas lieu chez les autres.

2) ou bien l'activité NADPasique que l'on sait exister dans les stromas globulaires (40) est différente chez les sujets au moment de l'hémolyse : une forte activité NADPasique donnerait un phénotype (A) (AB) (B), une faible activité, un phénotype (A) (B).

Sans avoir d'arguments décisifs pour le choix de l'une ou l'autre explication, nous penchons néanmoins vers la première qui nous paraît plus simple et plus fructueuse.

. Régulation in vivo de la G-6-P D

La G-6-P D est le premier enzyme de la voie des pentoses dont l'intérêt pour l'hématie réside dans la production du NADPH nécessaire au maintien à l'état réduit des groupes -SH de la globine et des constituants membranaires (2). Cet enzyme-clé, en tête d'une chaîne métabolique essentielle, doit voir son activité régulée pour répondre aux besoins immédiats de la cellule en NADPH. Un des éléments de ce système de régulation semble être l'un des deux substrats de l'enzyme, le NADP.

En étudiant l'inactivation par la chaleur des variantes A+ et A-, LUZZATTO et coll. (42) ont constaté qu'en diminuant la concentration en NADP on obtient une diminution concomitante de la température de transition de l'enzyme (= température qui laisse la moitié de l'activité initiale) et de la rapidité de la transition, ces deux phénomènes étant plus prononcés encore chez A- que chez A+. Ces a teurs concluent que cette découverte est en accord avec la thèse que le NADP est spécifiquement impliqué dans la stabilisation de la conformation active de l'enzyme.

Après la découverte de la conformation dimérique ou tétramérique de l'enzyme à l'état actif, COHEN et ROSEMEYER (43) et YOSHIDA et HOAGLAND (44) ont montré que le dimère actif contenait une molécule de NADP. D'après MOTULSKY (45), le dimère actif aurait un poids moléculaire d'environ 104 000 daltons ; il peut se dissocier en deux sous-unités inactives qui sont identiques ou bien très semblables, de PM d'environ 52 000 daltons. Etudiant l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration du NADP (l'autre substrat, le G-6-P

se trouvant à forte concentration), LUZZATTO (46) observe, sous certaines conditions expérimentales, une courbe d'allure sigmoïde ; l'interprétation la plus simple consiste à admettre l'existence d'au moins deux sites d'attachement du NADP sur l'enzyme, avec une transition d'une faible affinité vers une forte affinité pour le NADP lorsque la concentration en NADP augmente. Le problème est de savoir si la concentration critique en NADP a un sens physiologique et est un des éléments du mécanisme de régulation in vivo de l'activité catalytique de l'enzyme. LUZZATTO répond par l'affirmative en constatant que les concentrations du NADP (et du NADPH, autre produit qui modifie la courbe de l'activité enzymatique) dans les érythrocytes sont du même ordre de grandeur que les constantes de dissociation calculées à partir de son système in vitro.

La confrontation de toutes ces données précédentes avec nos résultats nous conduit aux conclusions suivantes :

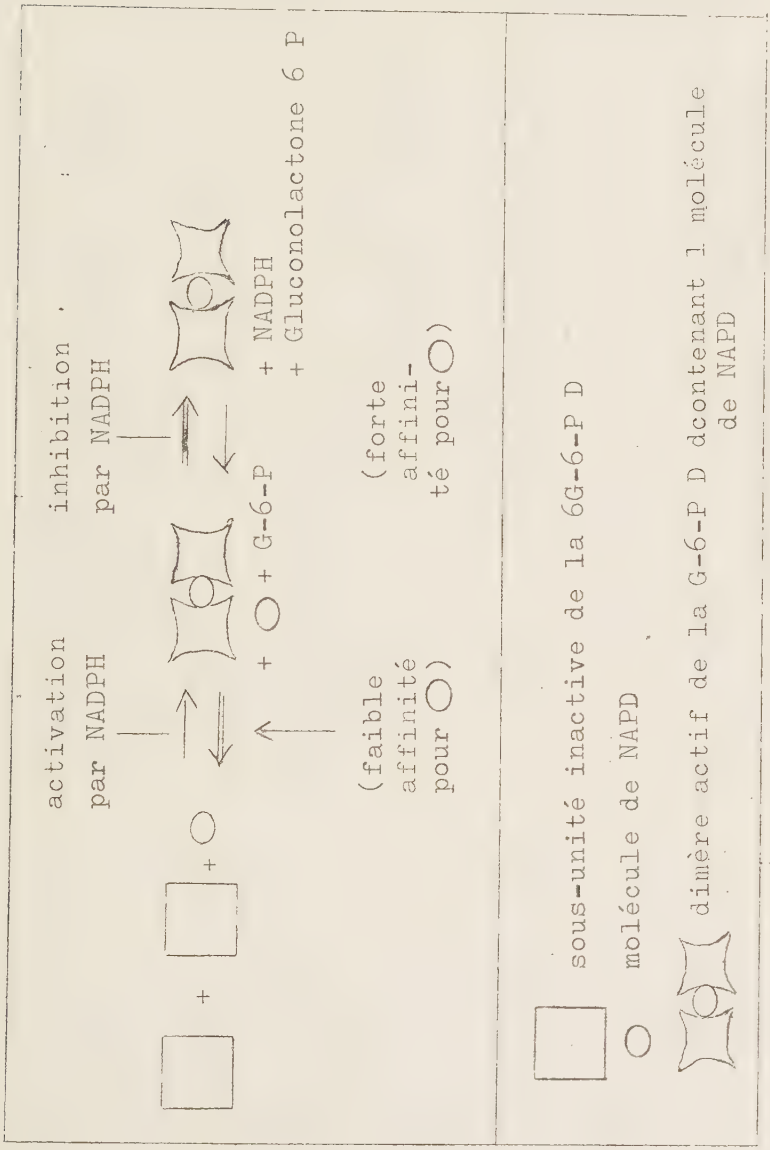
. il est probable que le NADP à partir d'une certaine concentration (qui dépend aussi de la concentration en NADPH) provoque la dimérisation des sous-unités inactives de l'enzyme ; le dimère est enzymatiquement actif, avec une forte affinité pour le NADP, l'un des substrats de l'enzyme. En faveur de cette assertion nous trouvons :

- les travaux de YOSHIDA déjà cités (38) (39)
- les travaux de LUZZATTO cités plus haut (46)
- le fait que l'absence de NADP sur le support d'électrophorère fait pratiquement disparaître toute bande de G-6-P D
- le fait que le NADP ajouté juste avant l'hémolyse chez les femmes (A) (AB) (B) modifie

leur phénotype en (A) (B). (Se reporter à la discussion sur l'inactivation du chromosome X, plus bas).

. Cette concentration critique en NADP paraît jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'activité enzymatique in vivo, d'après nos résultats ; l'explication de la découverte, chez les femmes génétiquement AB, tantôt du phénotype (A) (B), tantôt du phénotype (A) (AB) (B), serait la suivante : au-dessous de la concentration critique en NADP, il se produirait une dissociation en deux sous-unités de la molécule active et une réassociation au hasard des sous-unités sur le support d'électrophorèse additionné de NADP, donnant les trois dimères possibles AA, BB et AB ; au-dessus de la concentration critique en NADP, il n'y aurait pas de dissociation de la molécule active et donc à l'électrophorèse seuls les dimères AA et BB seront observés. On pourrait expliquer l'apparition d'une bande intermédiaire au cours du temps dans le mélange d'hémolysats A+ et B+ par la diminution progressive de la concentration du NADP vers le seuil critique.

• Modèle schématique de la régulation de la G-6-P D in vivo



Modèle schématique de la régulation de G-6-P D in vivo

- Réflexion sur la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose ou sur "cellogel"

L'observation d'une bande intermédiaire d'hybridation (AB) entre la bande (A) et la bande (B) ne peut être faite, si elle existe, que si les bandes (A) et (B) sont bien séparées l'une de l'autre à l'électrophorèse. Ce qui ne semble pas le cas dans la technique sur gel d'amidon couramment utilisée ; c'est ce que constatent YOSHIDA et coll. (37) qui, pour montrer l'hybridation entre les variantes A+ et B+ après purification partielle de l'enzyme et précipitations répétées par le sulfate d'ammonium, ont utilisé une technique chromatographique. L'électrophorèse sur acétate de cellulose ou sur "cellogel" au contraire laisse une distance suffisamment grande entre les bandes A et B pour détecter éventuellement une bande intermédiaire surajoutée aux deux premières. Si on ajoute à cela l'utilisation d'un support prêt à l'emploi et un temps de migration qui n'est que de 45 minutes environ, on comprendra tout l'intérêt de cette nouvelle technique d'électrophorèse pour l'étude de la G-6-P D.

- Problème de l'inactivation du chromosome X chez la femme

On connaît actuellement plusieurs cas d'hybridation moléculaire qui ont lieu très vraisemblablement dans le milieu cellulaire lui-même. C'est ainsi que chez le chat par exemple, THULINE et coll. (47) ont rencontré le phénotype électrophorétique suivant pour la Phosphogluconate Deshydrogénase : (A) (AB) (B), avec 25 p.cent de (A), 50 p.cent de (AB) et 25 p.cent de (B) ; les auteurs supposent de-

vant ces résultats que les deux allèles du locus de la Phosphogluconate Deshydrogénase qui est situé sur un autosome, produisent des sous-unités moléculaires d'efficacité enzymatique égale lorsqu'elles sont combinées dans le dimère ; que les deux allèles sont également identiques pour ce qui est de la production des sous-unités ; et que la polymérisation des sous-unités pour donner un dimère enzymatiquement actif a lieu dans la cellule productrice.

Pour ce qui est de la G-6-P D qui nous occupe, le locus codant pour cet enzyme est situé sur le chromosome X ; nous savons que les variantes A et B peuvent former in vitro des hybrides moléculaires ; cependant ces hybrides ne se forment jamais chez les femmes génétiquement AB si nous réalisons l'hémolysat dans une solution additionnée de NADP : donc ces hybrides n'existent pas dans le globule rouge. Ce fait est très en faveur de l'hypothèse émise par Mary LYON (48), de l'inactivation de l'un des chromosomes X chez la femme, inactivation qui ne permettrait jamais à une cellule de synthétiser en même temps le produit A et le produit B.

- La G-6-P D dans l'Evolution

Jusqu'ici peu d'hybridations interspécifiques ont été tentées. BEUTLER et COLLINS (49) puis DREYFUS et ROSA (50) ont réussi à obtenir l'hybridation de la G-6-P D humaine avec l'enzyme du Rat. BEUTLER et COLLINS (51) ont également obtenu un hybride entre les enzymes de Boeuf et de Rat. Il serait intéressant de continuer ces confrontations en essayant les techniques d'hybridation simples utilisées par DREYFUS et ROSA (50) ou bien même le simple mélange des hémolysats pendant un certain temps

(cf. nos observations plus haut), et la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose ou sur cellogel qui pourrait séparer entre elles les différentes bandes possibles.

La découverte éventuelle d'hybridations interspécifiques multiples serait très en faveur de l'importance fonctionnelle essentielle du site d'hybridation et apporterait un argument de poids pour l'affirmation de la régulation de l'activité enzymatique par le NADP en particulier.

-:-

CONCLUSIONS

-:-

Deux aspects de l'étude de la G-6-P D ont été présentés dans ce travail :

1) Une statistique portant sur des sujets de Côte d'Ivoire nous a montré que la fréquence des déficients en G-6-P D au test de Motulsky est importante dans cette région d'Afrique Occidentale (10 p.cent chez les femmes), ce chiffre étant comparable à celui que l'on rencontre dans les pays avoisinants. De même la fréquence des différents phénotypes électrophorétiques est similaire à celle que l'on trouve au Nigéria.

Dans cette étude plusieurs points sont à noter :

. La fréquence des déficients varie de façon appréciable d'un groupe d'ethnies à l'autre (par exemple les Krou et les Akan) et même d'une ethnie à l'autre à l'intérieur de chaque groupe (par exemple Guéré et Bété, au sein du groupe Krou). Cette différence entre ethnies vivant dans un environnement quasiment identique, retrouvée ailleurs dans ces régions, n'infirme aucunement l'hypothèse d'une pression de sélection des allèles "déficients" exercée par l'existence dans ces pays du paludisme malin à Plasmodium falciparum. En effet une sélection sur un allèle ne peut se faire que si cet allèle est apparu dans la po-

pulation considéré soit par mutation soit par migration (2) ; cela d'autant plus que dans le cas considéré d'autres anomalies génétiques, également sélectionnables (le trait sicklémique ou l'anomalie correspondant à la thalassémie par exemple) semblent conférer une résistance similaire.

. L'existence fréquente de déficients partiels chez les hommes au test de Motulsky pose le problème de leur interprétation puisque l'homme ne possède qu'un seul chromosome X. Deux explications au moins peuvent être données:

a) les tests utilisés n'ont aucune signfication génétique chez ces sujets débilités, souvent malnutris, exposés à de nombreuses infections microbiennes et parasitaires ; les hommes partiellement déficients porteraient en fait un gène normal.

b) les sujets, génétiquement déficients, montreraient néanmoins une activité partielle du fait d'une affection associée héréditaire ou non, d'autant plus que l'on sait que la mutation A- donne une déficience légère ou intermédiaire (41).

. Une grande discordance est apparue statistiquement entre les résultats des tests de Motulsky et de Brewer. Cette découverte assez surprenante pourrait être interprétée d'un point de vue physiopathologique (cf. L'explication a) précédente). Mais nous pensons néanmoins que derrière cette constatation pourrait se cacher un phénomène de type génétique autre qu'une déficience en G-6-P D, et qui pourrait toucher à un niveau précis un des gènes codant pour les différents enzymes de la chaîne qui va de la formation du NADPH à la réduc-

tion de la méthémoglobine. Il serait intéressant d'étudier les cas particuliers où existerait une nette divergence entre les deux tests précités ; une enquête familiale suivie d'une étude biochimique des enzymes concernés, pourrait peut être apporter une réponse précise à ce point.

2) A l'occasion de la découverte chez certaines femmes seulement (25 p.cent environ des AB) d'une bande intermédiaire en plus de la bande A et de la bande B, nous avons tenté d'aborder certains des problèmes fondamentaux que pose cet important enzyme qu'est la G-6-P D.

. Rattachant cette nouvelle bande intermédiaire à un phénomène d'hybridation moléculaire AB, nous avons proposé un schéma très simplifié de régulation in vivo de l'enzyme compte tenu de notre découverte et des nombreuses études enzymologiques et structurales aujourd'hui disponibles sur la G-6-P D. Le NADP semble y jouer un rôle primordial (mais probablement non exclusif, avec la participation au moins du NADPH) ; il constituerait le lien entre les deux sous-unités inactives de l'enzyme et le ferait ainsi passer sous une forme active avec une grande affinité pour le NADP qui est l'un de ses substrats.

Ce type de régulation, s'il se révèle exact, est intéressant. Si l'on connaît aujourd'hui beaucoup d'enzymes qui subissent in vivo une régulation de leur activité fonctionnelle, il est moins fréquent de voir une activation par l'un des substrats lui-même ; en outre l'activateur ici ne modifie pas uniquement la conformation de la protéine de telle sorte à rendre actifs ses sites catalytiques, mais aussi et en même temps il provoque la diméri-

sation des sous-unités inactives, révélant ainsi un site de polymérisation. Ce dernier site semble essentiel à en juger par sa fixité dans trois espèces de mammifères étudiées ; l'enzyme de Rat s'hybride en effet avec l'enzyme humain et avec l'enzyme de Boeuf indépendamment. Si cette fixité s'étendait à plusieurs autres espèces, cela apporterait selon nous un bon argument, bien qu'indirect, de l'importance du site de dimérisation pour la régulation de l'activité de l'enzyme.

. La découverte de femmes phénotypiquement (A) (AB) (B) à côté de femmes phénotypiquement (A) (B) pose le problème d'une éventuelle diminution de la concentration du NADP dans les érythrocytes des sujets (A) (AB) (B).

. Enfin la disparition de toute bande intermédiaire éventuelle lorsque l'on hémolyse les globules rouges en présence de NADP, apporte un argument supplémentaire de la validité de l'inactivation du chromosome X chez la femme, même si actuellement cette inactivation ne semble pas être absolue (52).

-:-

Vu :
Le Président :
Signé : G. SCHAPIRA

Vu :
Le Doyen :
Signé : F. DELBARRE

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :
Signé : R. MALLET

REFERENCES

-:-

(1) MOTULSKY A.G., CAMPBELL-KRAUT J.M. in BLUMBERG B.S. ed.
Proceedings of the Conference on genetic polymorphisms and geographic variations in disease.
New York, Grune & Stratton (1961).

(2) WHO Technical Report Series n°366 : Standardization of Procedures for the Study of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase - Geneva 1967.

(3) BREWER G.J. et al.
J. Amer. Med. Ass. 180, 386 (1962).

(4) KLEIHAUER & BETKE
Nature (London) 199, 4899, 1196-1187 (1963).

(5) CABANNES R. et coll.
Manuel technique pour l'étude des hémoglobinopathies et maladies apparentées.
Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie, Toulouse (1967).

(6) FAIRBANKS V.F., BEUTLER E.
Blood 20, 591 (1962).

(7) SPARKES R.S., BALUDA M.C., TOWNSEND D.E.
Cellulose acetate electrophoresis of human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. J. Lab. Clin. Med. 73, 3 (1969).

(8) SMITHIES O.
Zone electrophoresis in Starch gels : group variations in the serum of normal human adults.
Biochem. J 61, 629 (1955).

(9) KIRKMAN H.N., HENDRICKSON E.M.
Amer J. Hum. Genet. 15, 241 (1963).

(10) PORTER I.H. et al.
Lancet 2, 895 (1964).

(11) MATHAI C.K. et al.
Nature (London) 210, 115 (1966).

(12) STAMATOYANNOPOULOS et al.
Detection of G-6-P D deficient heterozygotes - Blood 29, 87-101 (jan. 1967).

(13) LINHARD J. et coll.
Bull. Soc. Med. Afr. Noire Langue Franç. 9, 269-270, (1964).

(14) ALLISON A.C. et al.
Nature (London) 190, 1198 (1961)

(15) KWON E.G. et al.
Trans Roy Soc Trop Med. Hyg. 59, 46 (1965).

(16) BOYER S.H. et al.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 48, 1[illegible]-1[illegible] (1962).

(17) GILLES H.M. et al.
Ann. Trop. Med. Parasit. 55, 64-69 (1961).

(18) HARRIS R. et al.
Ann. Hum. Genet. 26, 199-206 (1961).

(19) LUZZATTO L. et al.
Biochem. J. 97, 19 (1965).

(20) PORTER I.H. et al.
Lancet 1, 895-899 (1964).

(21) WHO Technical Report Series n°338 (1966).

(22) MOTULSKY A.G. et al.
Amer. J.Hum. Genet. 18, 514-537 (1966).

(23) SONNET J. et al.
Nature (London), 188, 504 (1960).

(24) ALLISON A.C.
Nature (London), 186, 531 (1960).

(25) LUTTRELL V. et al.
E afr.Med.J. 42, 313-315 (1965).

(26) MARTI H.R. et al.
Brit. Med. J 1, 1476 (1965).

(27) BERNSTEIN R.E.
S Afr. Med. J. 37, 447-451 (1963).

(28) BERNSTEIN R.E.
S Afr. J. Med. Sci. 28, 111-114 (1963).

(29) CHARLTON R.W.
Brit. Med. J 1, 941 (1961).

(30) DODIN A.
Arch. Inst. Pasteur Madagascar 33, 233-236 (1965).

(31) MARKS P.A. et al.
J. Clin. Invest. 38, 2253-2262 (1959).

(32) YOSHIDA A. et al.
Science 155, 97-99 (1967).

(33) VERGNES H.
Bull. Soc. Anthrop. Paris 7, 301-322 (1965).

(34) RAGAB A.H. et al.
Amer. J. Hum. Genet., 18, 21-25 (1966).

(35) ADAM A. et al.
in Proceedings of the IInd International Conference on Human Genetics, Rome 1961.

(36) SHEBA C. et al.
Amer. J. Phys. Anthrop. 20, 167 (1962).

(37) YOSHIDA A. et al.
Nature 216, 277 (october 21, 1967).

(38) YOSHIDA A.
J. Biol. Chem. 241, 4966 (1966).

(39) YOSHIDA A.
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 835 (1967).

(40) GIBLETT R.E.
in Genetic markers in human blood. Blackwell Scientific Publications (1969).

(41) Congrès de Genève (juin 1971).

(42) LUZZATTO L. et al.
Biochem. Biophys. Res. Commun 21, 547 (1965).

(43) COHEN P. et al.
Europ. J. Biochem. 8, 8-15 (mar. 1969).

(44) YOSHIDA A. et al.
Biochem. Biophys. Res. Commun 40, 1167-1172 (1970).

(45) MOTULSKY A.G.
Communication au Congrès de Genève, juin 1971.

(46) AFOLAYAN A., LUZZATTO L.
Biochem. 10, 3, 415-419 (1971).

(47) THULINE et al.
Science 157, 431 (1967).

(48) LYON M.P.
Nature (London) 190, 372 (1961).

(49) BEUTLER E., COLLINS Z.
Science 150, 1306 (1965).

(50) DREYFUS J.C., ROSA R.
Résultats non publiés cités dans Exposés annuels de Biochimie Médicale, Masson(1969), p.101.

(51) BEUTLER E.
Experientia 22, 12 (1966).

(52)

SERMENT

-:-

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

-:-